doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2017.02.24
分子影像学杂志2017年第40卷第2期

基础研究

敲除TPX2基因可以降低乳腺癌干细胞活性及增加放疗敏感性

黄超有[1]，吴德华[2]，韩 铮[1]，朱珊珊[1]
[1]广州市番禺区何贤纪念医院乳腺甲状腺外科，广东 广州 511400；[2]南方医科大学南方医院放疗科，广东 广州 510515

摘要：目的 研究TPX2基因对乳腺癌干细胞活性及放疗敏感性的影响。**方法** 使用蛋白质印迹法检测TPX2基因在乳腺癌细胞及组织中的表达情况。使用RT-PCR检测TPX2基因在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达差异。使用慢病毒干扰载体建立稳定低表达TPX2蛋白的乳腺癌细胞。平板克隆、MTT试验验证TPX2对乳腺癌细胞生长能力的影响。流式细胞仪检测敲除TPX2之后对乳腺癌细胞凋亡比率的影响。检测CD44阳性细胞比例、肿瘤球形成能力以及侧群细胞比例，验证敲除TPX2之后对乳腺癌干细胞活性影响。**结果** TPX2基因在乳腺癌组织及细胞中表达水平明显升高（$P<0.05$）。敲除TPX2之后，可以使乳腺癌细胞生长能力减弱并促进细胞凋亡。TPX2敲除后，可以降低乳腺癌干细胞活性及提高放疗敏感性。**结论** TPX2为促进乳腺癌细胞生长的一个癌基因，其可通过提高乳腺癌干细胞活性来影响乳腺癌细胞的放疗敏感性。
关键词：TPX2；肿瘤干细胞；放疗敏感性；乳腺癌

近年来，随着乳腺外科手术技术和妇科肿瘤学的不断发展，乳腺癌的预后仍不容乐观，目前常规手术结合放化疗的综合治疗，其5年生存率只有54.5%[1]。恶性乳腺癌中的一小群乳腺肿瘤干细胞（BTSC）具有自我更新功能并呈现显著的放射抵抗性，是放射抵抗性的根源。CD44+作为乳腺肿瘤干细胞的一个重要标志物，在不同恶性级别的乳腺癌中比例不同，已有研究证实CD44+细胞是放疗抵抗的根源之一[2-3]。此外，还可以使用肿瘤球形成能力以及侧群细胞的比率来衡量BTSC的活性[4-7]。

TPX2是近年来研究比较热的一个基因，研究发现其在多种恶性肿瘤，如食管癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、人脑胶质瘤、唾液腺癌及卵巢癌中均有高表达，并且其高表达与肿瘤的生物学行为密切相关，阻断其表达可抑制肿瘤细胞的生长[8-10]。TPX2的下调在许多肿瘤细胞系中均导致细胞凋亡性死亡[11]，但是TPX2在乳腺癌的表达情况、其与BTSC及乳腺癌细胞的放疗敏感性关系，尚未充分明确。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

乳腺癌细胞株及永生化乳腺上皮细胞MCF-10A购买至上海中科院。所有细胞使用DMEM培养基（含10%胎牛血清），放置于含5%CO_2的37 ℃的培养箱中培养。

1.2 实时荧光定量PCR及蛋白质印迹法试验

提取细胞RNA使用TRIzol试剂法（Invitrogen）。实时荧光定量PCR的试剂盒（qSYBR-green-containing PCR kit）购自上海吉凯。

收稿日期：2017-02-06
作者简介：黄超有，E-mail: cjbabay@126.com；

提取细胞蛋白质后，使用蛋白质印迹法检测相关蛋白在细胞中的表达水平。TPX2以及GAPDH抗体购自santa cruz。二抗购自中杉金桥。ECL显色发光试剂盒购自康维世纪。

1.3 细胞凋亡试验

检测细胞凋亡试剂盒（FITC-PI双染色）购自凯基公司。细胞染色后，使用流式细胞仪检测相关凋亡情况。

1.4 构建低表达TPX2基因的乳腺癌细胞

根据TPX2基因（NM-1003620）序列，设计合成已证实能稳定沉默TPX2基因的片段（shTPX2）。使用PCR技术，将shTPX2基因片段构建到慢病毒载体（pLK0.1）中。包装慢病毒，使用慢病毒上清感染MCF7细胞。根据绿色荧光蛋白筛选出稳定感染的细胞。

1.5 裸鼠皮下成瘤实验

将裸鼠随机分成4组，每组5只。将1×10^6个细胞接种于裸鼠皮下，接种后5 d，按以下方式处理：第1组为空白对照组，第2组为单纯放疗组，第3组为sh-TPX2组，第4组为放疗+sh-TPX2组。肿瘤体积每3 d监测1次。肿瘤体积使用$V=\pi/6$（高度×长度×宽度）公式计算。

1.6 统计学处理

使用SPSS 13.0软件进行统计学分析。两组之间的差异使用两独立样本t检验。多组之间的差异使用方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TPX2在乳腺癌细胞和组织中表达上调

本研究使用蛋白质印迹法试验检测TPX2在一系列乳腺癌细胞以及永生化乳腺上皮细胞MCF-

10A表达的差异。结果提示，乳腺癌细胞株中TPX2的表达水平显著高于非癌细胞MCF-10A（图1，$P<0.05$）。实时荧光定量PCR试验结果提示：与癌旁组织相比，乳腺癌组织中TPX2显著升高。

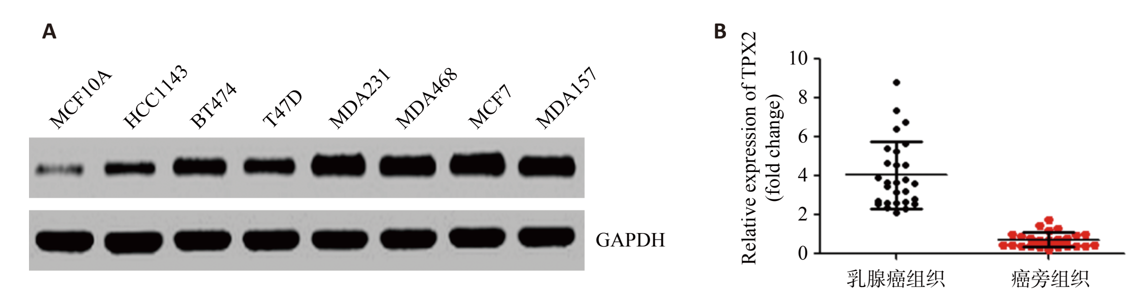


图1 TPX2在乳腺癌细胞和组织中表达

A：乳腺癌细胞株中TPX2的表达水平显著高于非癌细胞MCF-10A；*B*：乳腺癌组织中TPX2的表达水平显著高于癌旁组织.

2.2 敲除TPX2可以抑制乳腺癌细胞增殖及促进凋亡

由于TPX2可能作为乳腺癌的一个促癌基因，本研究验证敲除TPX2之后，乳腺癌MCF-7细胞的相关功能变化。首先使用慢病毒感染MCF-7细胞，建立低表达TPX2蛋白的细胞株（图2A）。平板克隆试验发现：敲除TPX2蛋白后，MCF-7细胞形成克隆的数目和大小较空白对照组明显减弱（图2B，$P<0.05$）。MTT试验发现敲除TPX2蛋白后，细胞生长的速度明显减慢（图2C）。凋亡试验发现敲除TPX2蛋白后，可以促进MCF-7细胞的凋亡（图2D）。

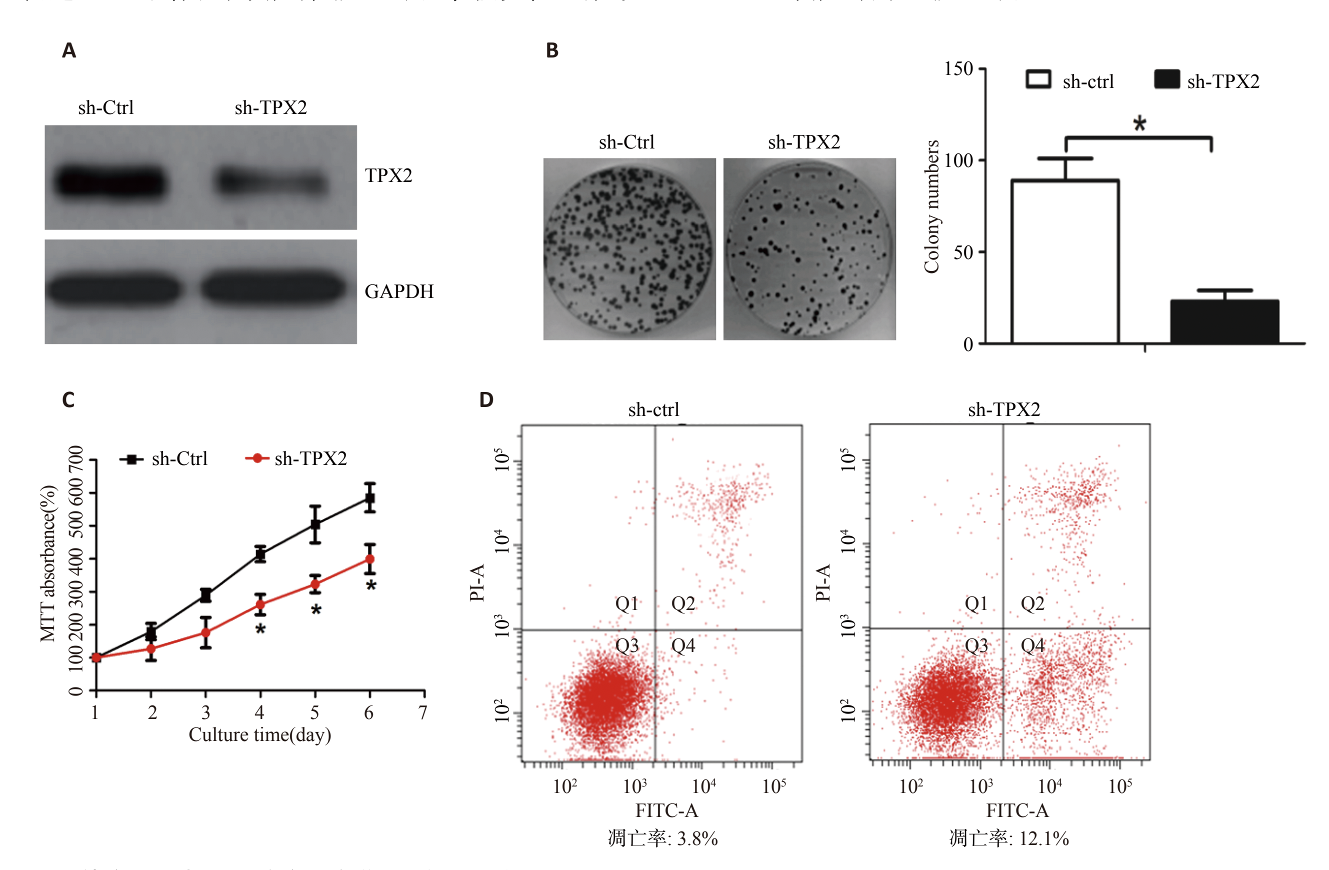


图2 敲除TPX2抑制乳腺癌细胞增殖及促进凋亡

A：蛋白质印迹法验证敲除TPX2的效率；*B*：平板克隆试验提示敲除TPX2基因后，MCF7细胞形成克隆能力下降；*C*：MTT试验提示敲除TPX2基因后，MCF7细胞生长能力减弱；*D*：凋亡试验提示敲除TPX2基因后，MCF7细胞凋亡比率增加；$^*P<0.05$.

2.3 敲除TPX2可以减低乳腺癌干细胞活性及提高放疗敏感性

进一步研究TPX2基因是否可以影响乳腺癌干细胞活性及放疗敏感性，发现敲除TPX2基因之后，MCF7细胞中CD44+细胞的比例明显下降（图3A）。同时，MCF7细胞中侧群细胞的比例（图3B），以及形成肿瘤球的能力（图3C）也是显著下降的。

研究TPX2基因是否可以影响乳腺癌细胞的放疗敏感性，结果发现敲除了TPX2基因之后，MCF7细胞对放疗的敏感性升高（图3D）。

2.4 体内试验

使用裸鼠皮下成瘤试验，验证敲除了TPX2基因

之后，乳腺癌细胞生长能力及对放疗敏感性的变化情况。结果发现：TPX2基因敲除后，MCF7细胞皮下成瘤的能力下降。与对照相及单纯放疗组相比，敲除了TPX2基因之后可使放疗的敏感性增加(图4)。

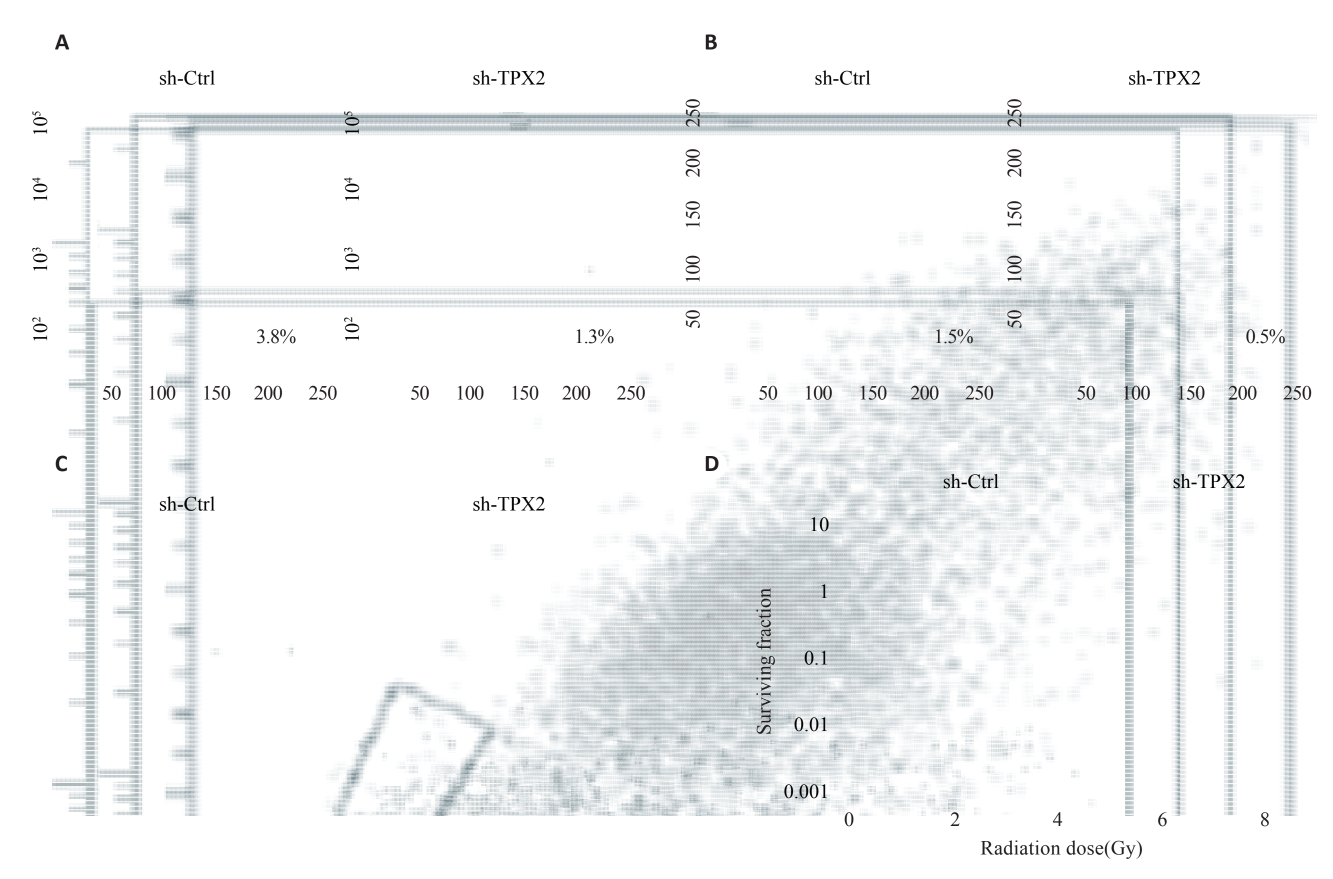


图3 敲除TPX2减低乳腺癌干细胞活性及提高放疗敏感性

A：敲除TPX2基因后，CD44+细胞的比例明显下降；*B*：敲除TPX2基因后，MCF7细胞中侧群细胞比例下降；*C*：敲除TPX2基因后，MCF7细胞形成肿瘤球能力下降；*D*：敲除TPX2基因后，MCF7细胞对放疗敏感性增强.

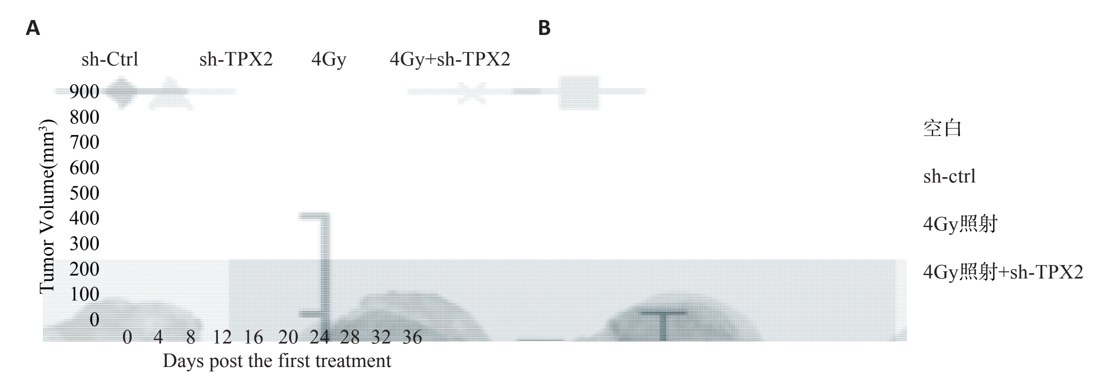


图4 敲除TPX2基因增加放疗敏感性

A：和空白对照组、sh-TPX2组、放疗射线(4Gy)单独作用组相比，放疗射线(4Gy)联合TPX2敲除组的成瘤速度明显减慢；*B*：和空白对照组、sh-TPX2组、放疗射线(4Gy)单独作用组相比，放疗射线(4Gy)联合TPX2敲除组的成瘤体积明显减小.

3 讨论

肿瘤干细胞能促使肿瘤细胞逃脱机体免疫系统的监控，从而导致肿瘤形成和无限生长。肿瘤干细胞能够耐受传统的细胞毒化疗和放射治疗，是肿瘤复发、转移及治疗耐受的根本原因。肿瘤干细胞和放疗抵抗密切相关：肿瘤干细胞对放疗产生抵抗的原因可以归结为以下几点：①放射通过引起DNA双链断裂和DNA-蛋白交联，最终导致细胞死亡。因此DNA的修复能力是影响细胞存活或者死亡的重要因素。肿瘤干细胞比普通肿瘤细胞具有更强的DNA修复能力，所以在相同的放疗剂量下，能够更好地存活[12]。②细胞周期可影响细胞对放疗的敏感性。一般而言，处于有丝分裂期(M期)的细胞对放疗相对敏感。肿瘤干细胞较长时间处于G0静滞期，相对处于休眠状态，细胞周期的推进较为缓慢，这导致了CSC对放疗的敏感性大大降低[13]。

乳腺癌细胞中存在一定比例的BTSC，这类细胞具有肿瘤干细胞活性。BTSC可能是乳腺癌细胞产生

放疗抗性的根本原因，阻断BTSC的活性能够使乳腺癌患者对治疗更好的获益。目前，可以使用CD44表明抗原标记物，肿瘤球形成能力以及侧群细胞的比率来衡量BTSC的活性[14]。TPX2基因在很多实体瘤里面被普遍认为是一个促癌基因，比如：TPX2蛋白高表达和晚期透明细胞肾癌具有正相关性，是该类肾癌患者根治术后的预后预测指标之一[15]。TPX2蛋白高表达还可以通过活化AKT信号通路，从而促进胶质瘤细胞的生长和侵袭水平[16]。在胃癌中，TPX2蛋白可作为患者预后的指标，其水平升高预示患者预后不佳[17]。TPX2还可以促进肝癌细胞的增殖，抑制凋亡，并通过上皮-间充质转化导致肝癌细胞的侵袭[18]。但TPX2在乳腺癌中的表达情况及作用尚未充分明确。本研究发现，TPX2基因在乳腺癌组织及细胞中的表达水平都是升高的，其可能作为一个促癌基因。进一步的细胞功能发现，TPX2基因可以促进乳腺癌细胞的生长能力。而敲除TPX2基因之后，可以促进细胞的凋亡。本研究结果充分表明TPX2可以通过促进生长，抑制凋亡，从而导致肿瘤的发生和进展。有意思的是，敲除TPX2基因之后，还可以使乳腺癌干细胞的活性下调，从而使乳腺癌细胞的放疗敏感性增加。裸鼠体内试验结果与体外试验一致，充分肯定了TPX2基因可增加BTSC活性，及导致乳腺癌细胞产生放疗抗性。

基于TPX2在乳腺癌中的重要作用，本研究认为：靶向TPX2基因的治疗，有可能为克服临床上乳腺癌细胞的放疗抗性提供新的治疗思路。

参考文献:

[1] Wu SG, He ZY, Zhou J, et al. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer[J]. Breast, 2014, 23(1): 88-93.

[2] Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, et al. Schmitt F and paredes J. breast Cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(11): 937-46.

[3] Weng D, Song B, Koido S. Immunotherapy of radioresistant mammary tumors with early metastasis using molecular chaperone vaccines combined with ionizing radiation[J]. J Immun, 2013, 191(2): 755-63.

[4] Britton KM, Kirby JA. Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis[J]. Cancers, 2011, 3(2): 2106-30.

[5] Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential[J]. Oncology reports, 2011, 25(1): 289-96.

[6] Cao L, Zhou Y, Zhai B, et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines[J]. BMC Gastroent, 2011, 23(11): 71-6.

[7] Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines[J]. J Vis Exp, 2015, 9(7): 12-8.

[8] Wei P, Zhang N, Xu Y, et al. TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer[J]. J Transl Med, 2013, 11(6): 31-3.

[9] Neumayer G, Helfricht A, Shim SY, et al. Targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2 (TPX2) regulates gamma-Histone 2AX (gamma-H2AX) levels upon ionizing radiation[J]. J Biol Chem, 2012, 287(50): 42206-22.

[10] Neumayer G, Belzil C, Gruss OJ, et al. TPX2: of spindle assembly, DNA damage response, cancer cellular and molecular life sciences[J]. CMLS, 2014, 71(16): 3027-47.

[11] Yang Y, Li DP, Shen N, et al. TPX2 promotes migration and invasion of human breast cancer cells[J]. Asian Pacif J Trop Med, 2015, 8(12): 1064-70.

[12] Bao S, Wu Q, Mclendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. Nature, 2006, 444(20): 756-60.

[13] Shima H. Acquisition of G(0) state by CD34-positive cord blood cells after bone marrow transplantation[J]. Exp Hematol, 2010, 38(12): 1231-40.

[14] Xun J, Wang DK, Shen L, et al. JMJD3 suppresses stem cell-like characteristics in breast cancer cells by downregulation of Oct4 independently of its demethylase activity[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 21918-29.

[15] Glaser ZA, Love HD, Guo S, et al. TPX2 as a prognostic indicator and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma[J]. Urol Oncol, 2017, 13(5): 286-93.

[16] Gu JJ, Zhang JH, Chen HJ, et al. TPX2 promotes glioma cell proliferation and invasion via activation of the AKT signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2016, 12(6, B): 5015-22.

[17] Liang B, Zheng WJ, Fang L, et al. Overexpressed targeting protein for Xklp2 (TPX2) serves as a promising prognostic marker and therapeutic target for gastric cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(8): 824-32.

[18] Liang B, Jia CH, Huang Y, et al. TPX2 level correlates with hepatocellular carcinoma cell proliferation, apoptosis and EMT[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(8): 2360-72.